

Sıçanlarda Spinal Kord ve Medullada Opioid Reseptörlerinin Otohistoradyografik Yöntemle Gösterilmesi*

Süreyya CEYLAN
Afet Solmaz ÖZORAN
Savaş CEYLAN
Bikem SÜZEN
Suat ERKUL
Yavuz ÖZORAN
Gülay YEĞİNOĞLU
Gürcan ÜREMEK

A UTORADIOGRAPHIC LOCALIZATION OF
OPIATE RECEPTORS SPINAL CORD
AND MEDULLA IN RATS

KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji, Anatomi B.D. ve Patoloji A.B.D.
Trabzon Numune Hast. Beyin Cerrahi B.D. ve Trabzon Doğum Hast. Patoloji B.D.

Geliş tarihi 26 Haziran 1989
Kabul Tarihi; 11 Kasım 1989

ÖZET

Bu çalışmada, sıçanlarda spinal kord ve medulla (butbus) da opioid reseptörlerini otohistoradyografik yöntemle gösterilmesi amaçlandı. 150-200 g ağırlığında beyaz erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlarda kuyruk veninden 200 mCi /H3j diprenorfin verildi. Bir saat sonra sıçanların spinal kord ve medullası çıkarılarak frozen kesit aletinde seri kesitler alındı. Kesit yüzeyleri fotoğraf emülsiyonu (Kodak NTB3) ile kaplandı. 4-8 haftalık inkübasyon periyodundan sonra siyah-beyaz film banyosu yapıldı ve Pirouin - Yile boyanarak kapatıldı. Mikroskopik incelemede spinal kordun servikal bölgesinden alınan seri kesitlerde endojen opioid reseptörlerinin lamina I ve lamina II de çok yoğun grain dağılımı gösterdiği görüldü. Medullada ise, periventriküler cevherde nükleus traktus solitarius'da ve spinal trigeminal nükleus ve traktusunda çok yoğun grain dağılımı görüldü. Nükleus olivarius inferior da ise, orta derecede grain dağılımı görüldü.

Anahtar Kelimeler Endojen opioid reseptörleri, Otohistoradyografi, Spinal kord, Medulla.

T Kİ Tıp Bil Araş Dergisi, C.8, S.2, 1990, 97-102

GİRİŞ

Yetmişli yıllardan bu yana, bilim dünyasına giren endojen opioidlerin fizyolojik ve endokrin etkilerinin ortaya konması, aynı zamanda şok,

"Bu çalışma, K.T.Ü Araştırma Fonunca desteklenmiştir. (Kod No:86.114.001.1).

Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri ARAŞTIRMA Dergisi C.8, S.2, 1990
Turkish Journal of RESEARCH in Medical Sciences V.8, N.2, 1990

SUMMARY

In this study, the localization of opiate receptors in the spinal cord and lower medulla has been elucidated by the autoradiographic identification of [³H] diprenorphine (a potent opiate antagonist) binding sites. 30 male rats (150-200 g) were administered 200 mCi of diprenorphine (9,8 Ci/mole, Amersham Searle) by tail vein injection in 0,3 ml saline. Animals that were administered [³H] diprenorphine were sacrificed by decapitation immediately after injection and spinal cords and lower medulla removed rapidly and 2 to 5 mm slices of various regions were mounted on open block supports and quickly frozen by partial immersion. In spinal cord sections from lumbar and cervical regions, autoradiographic grains showed a remarkably selective localization to the most dorsal portions of the dorsal horn lamina I and II in thoracic sections of cervical cord, a high autoradiographic grain density was localized to the gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus, nucleus tractus solitarius and periaqueductal gray matter.

Key Words: Endogenous opiate receptor, Autoradiographic, Spinal cord, Medulla.

T J Research Med Sci. V.8, N.2, 1990, 97-102

serebrovasküler olaylar gibi hastalıklarında fizyopatolojisinde rol oynadıklarının gösterilmesi, bu konuya olan ilgiyi artırmıştır. Son on yıl içerisinde, bu konuya olan ilgiyi artırmıştır. Son on yıl

içersinde, endorfinlerle ilgili araştırmalar yanında, bunların bağlandığı reseptörler ve bu reseptörlerin bulunduğu dokular üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (4,5,6,7,8,9,11,13,17).

Şimdiye değin, birçok tipi (13) belirlenmiş olan endojen opioid reseptörlerinin saptanmasında; bioassay, immunhistokimya ve otohloradyografi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Bu yöntemler arasında otohloradyografi uygulama alanı yönünden ilk sırayı almaktadır. Ülkemizde endojen opioid reseptör blokörü olan farmakolojik ajanların kullanımı ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar yapılmıştır (14). Buna karşın, konu ile ilgili reseptör düzeyinde otohloradyografi yöntemi esas alınarak yapılmış morfolojik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, ileri çalışmalara başlangıç oluşturmak üzere, günümüzde önemi giderek artan endojen opioid reseptörlerinin spinal kord ve medulla oblongatada dağılımının laboratuvarımızda otohloradyografik yöntemle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Atweh ve Kuhar'ın (2) endojen opioid reseptörlerinin otohloradyografik yöntemle belirlenebilmesinde kullandıkları yöntem esas alınarak bu çalışma planlanmıştır.

Ülkemizde ilk kez çalışılan bu konuda, yöntemin kurulabilmesi ve amaçlanan sonuca ulaşılması nedeniyle, bu ön çalışmanın ileri çalışmalara olumlu katkısı olabileceği düşünülmüştür.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmamızda, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan homojen bir sustan, 150-200 g ağırlığında 30 adet erkek beyaz sıçan kullanıldı. Ön çalışmalarda kontrol grubu hayvanların bir kısmında kuyruk venlerini bulma ve çok kısa sürede spinal kord ve medullanın çıkarılması alıştırılmaları yapıldı. Deneysel öncesi hayvanlara 40 mg/kg nembotal intraperitoneal olarak uygulandı. Daha sonra 200 jxCi [H3] diprenorfin* 0,3 ml serum fizyolojik ile kuyruk

veninden her sıçana verildi. Kontrol grubu sıçanlara yalnızca (0,3)ml serum fizyolojik kuyruk veninden enjekte edildi.

Diprenorfinin reseptörlerle bağlanması için gerekli olan bir saatlik süre sonunda, hem deney grubu, hem de kontrol grubu sıçanlarda spinal kordun servikal bölgesi total olarak çok kısa sürede ve zedelenmeden çıkarıldı. Spinal kord ve medulla frozen kesit aletinde -20°C de şok ile dondurulduktan sonra transvers palanda 2-3 mm lik kesiler yapıldı. Bu doku parçalarından Reicher-Jung Cryocut E frozen kesit aleti ile 6-10 mikrometre kalınlığında kesitler asit solüsyonuyla yıkanmış temiz lamalar üzerine alındı. Önceden hazırlanmış karanlık odada distile su ile 1:1 oranında sulandırılmış ışık mikroskopik otohloradyografik tekniğinde kullanılan ve [H3] diprenorfin ile uyumlu özel fotoğraf emülsiyonu Kodak NTB3** (Nüclear tract solüsyonu) 25 ml'lik beherglass içine tek tek daldırılarak kesit yüzeylerinin emülsiyonla kaplanması sağlandı. Kesitin bulunmadığı lam yüzeyi yumuşak kağıtla silinerek temizlendi. Silikajel yerleştirilmiş özel kutulara alınan lamalar, karanlık odada 2-4 °C ye ayarlanmış buzdolabına kaldırıldı. Fotoğraf emülsiyonunun poz süresi için 4-8 hafta gerekli oldu. bu süre sonunda, her grupta kontrol preparatlarının banyosu ile tespit edildi.

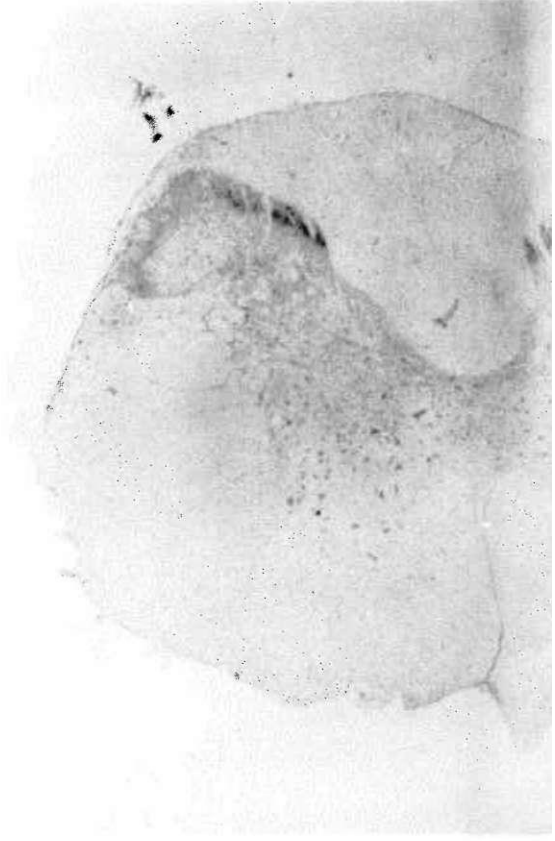
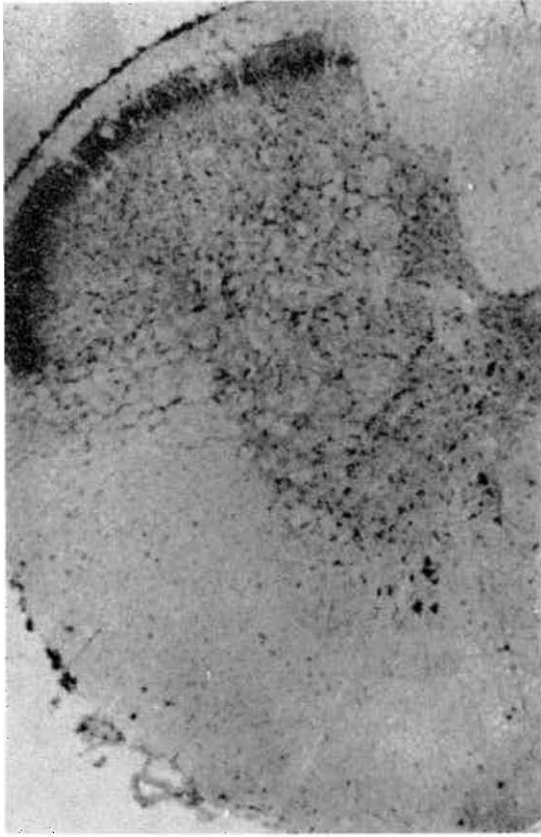
İnkübasyon periyodu sonunda emülsiyon kaplı lamalar oda sıcaklığına getirildi. Her preparat karanlık odada özel şalelerde dektol (siyah-beyaz film banyosu) ve film tespit solüsyonu ile muamele edildi. Mikroskop altında banyo işlemi kontrol edilen lamalar Carnoy solüsyonuyla tespitten sonra, Pironin-Y ilce boyandı. Lamalar balsam ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak mikroskop altında incelendikten sonra Carl-Zeiss Jena-Jenoval marka foto mikroskopunda siyah-beyaz (orwo) ve renkli (kodak) filmleri çekildi.

BULGULAR

200 jxCi [H3] diprenorfin verilen sıçanların santral sinir sisteminden elde edilen kesitlerde

[H3] ile işaretlenmiş opioid antagonisti diprenorfin [15,16 (n)-H3] (25-50 Ci/mmol) İngiltere'den Amersham laboratuvarından temin edildi.

Kodak NTB3 fotoğraf emülsiyonu (Eastman Kodak Rochester Nuclear Track Solüsyonu) Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri (U.A.E.) den temin edildi.



Şekil 1: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda spinal korddan lamina I ve lamina II de grain dağılımı çok yoğun olarak izlenmektedir. Piroin-Y x 3.2.

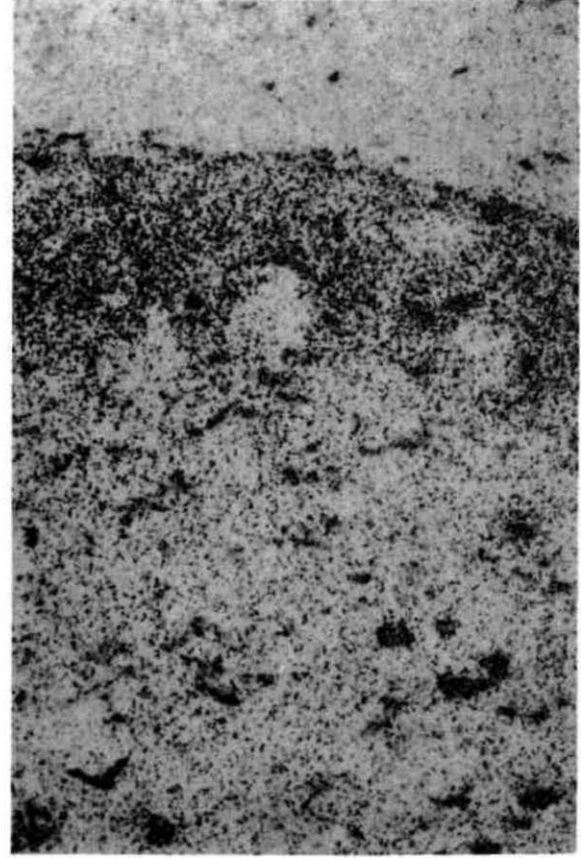
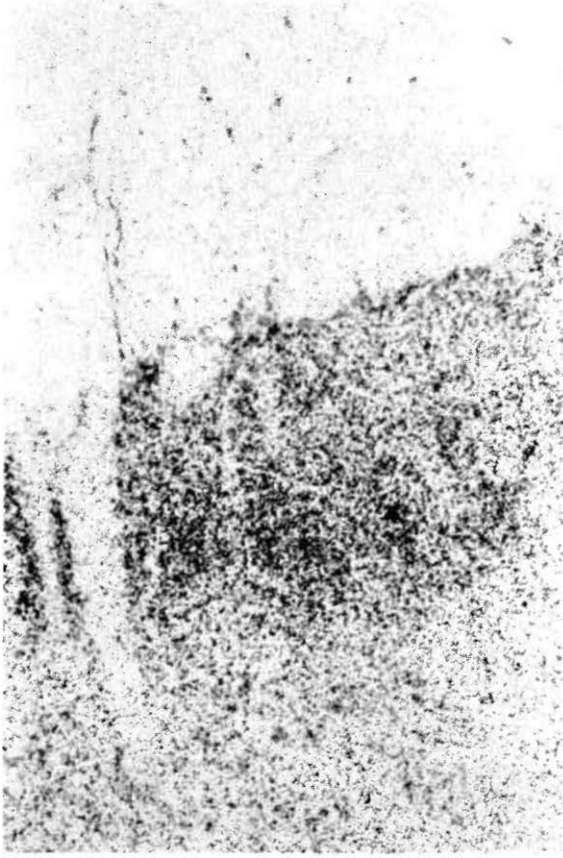
Tablo — I

**Spinal Kord ve
Medulla'da Otohistoradyografik Grain
Yoğunluğu**

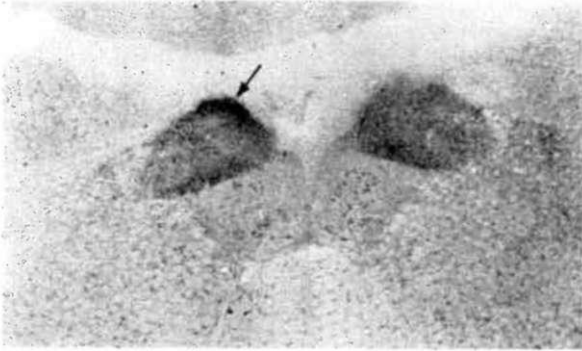
Grainyoğunluğu derecesi	Anatomik bölgeler Spinal kord -Irmına I -Lamina II
Çokyoğun	Bulbus -Periventriküler gri cevher -Nukleus traktus solitarius
Orta derecede yoğun	Medulla (Bulbus) -Nukleus olivarius inferior
Azyoğun	Spinal kord -Ön boynuz -Beyaz cevher

grain yoğunluğ Atweh'e (2) göre, ayrı ayrı değerlendirildi. Buna göre, [H3] diprenorfin tutulumu gösteren alanlar az yoğun, orta derecede youn, çok yoğun olarak derecelendirilirdi [H3] diprenorfin verilen sıçanların spinal kordun servikal bölgesinden alınan seri kesitlerde, arka boynuzda lamina I ve lamina H'de otohistoradyografik grain yoğunluğu, diğer dağılımı yönünden de çok yoğun alanlara uyuyordu. Spinal kordun ön boynuzu ve gri cevherin diğer kısımlarında grain yoğunluğu son derece azdı (Şekil 1,2).

[H3] diprenorfin verilen sıçanlarda medulla oblongatada önde piramidler, arkada 4. ventrikül alt yarısından geçen seviyeden yapılan kesitlerde periventriküler gri cevherde nükleus traktus solitarius, spinal trigeminal nükleus ve traktusu grain dağılımı yönünden çok yoğun alanlara uyuyordu (Şekil 3-5-6). Nükleus olivargus inferiorda orta derecede grain yoğunluğu dikkati çekti (Şekil 4).



Şekil 2: [H3] diprenofin verilmiş sıçanda spinal kordun arka oynuzunda lamina I ve lamina U'de çok yoğun grain dağılımı izlenmektedir. Pironin-Y x 25.



Şekil 3: [H3] diprenofin verilmiş sıçanda medulla'dan geçen transvers kesitte periventriküler gri cevherde (ok) grain dağılımı yoğun olarak izlenmektedir. Pironin-Y x 3.2.

TARTIŞMA

Son yıllarda memeli beyin ve spinal kordunda opioid reseptörlerinin dağılımlarını otohstoradyografik yöntemle gösteren çalışmalar yapılmıştır (1,2,3,15,17).

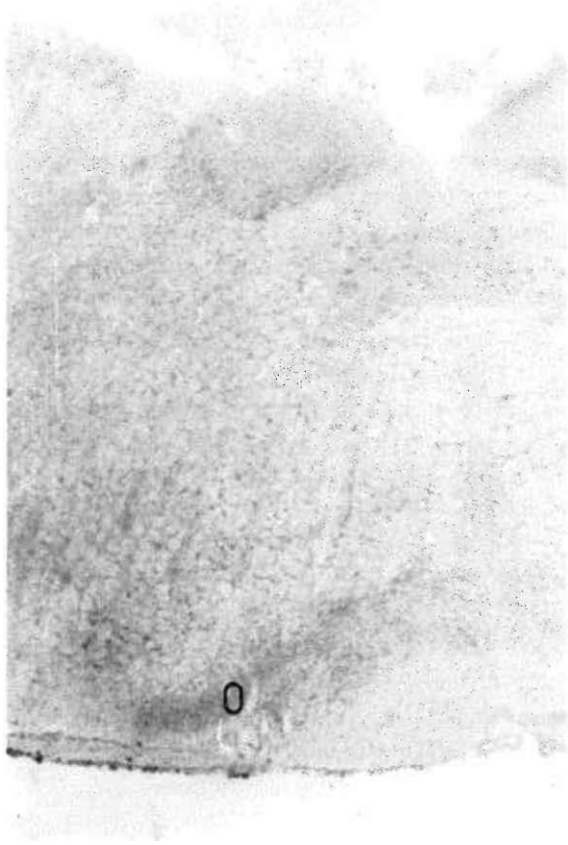
Bu çalışmalarda, opioid reseptörlere bağlanma yeteneği olan agonist ve antagonist ajanlar kullanılmıştır (2,15,17).

Çalışmamızda, reseptörlere olan yüksek afinitesi ve bağlandıktan sonra düşük ısılarında çok yavaş ayrılma hızı göstermesi nedeniyle, reseptör blokörü olarak opioid antagonisti diprenorphine seçilmiştir.

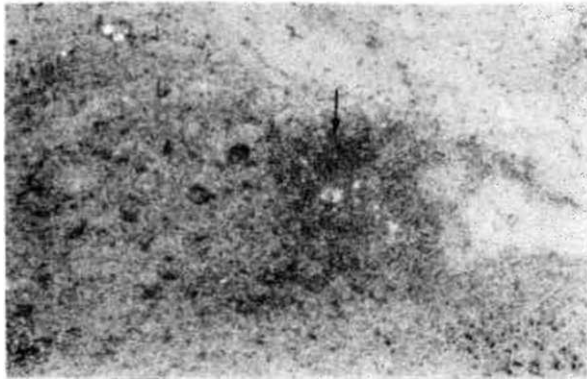
İlk kez opioid reseptörleri 1976 yılında köpek spinal kordlarında gösterilmiştir. Bu reseptörler, Yunan alfabesindeki harflere göre, mü, kappa ve sığma reseptörleri olarak adlandırılmıştır. Aynı yıl içerisinde, fare vasa deferensinde dördüncü bir reseptör tipi olan delta reseptörleri gösterilmiştir.

Son on yıl içerisinde devam eden araştırmalarla, 1979 yılında psilon, 1983 yılında da lambda reseptörleri bulunmuştur (13).

1976 yılında atweh ve Kuhar'ın yapmış olduğu çalışmada, opioid reseptörlerinin spinal kordun

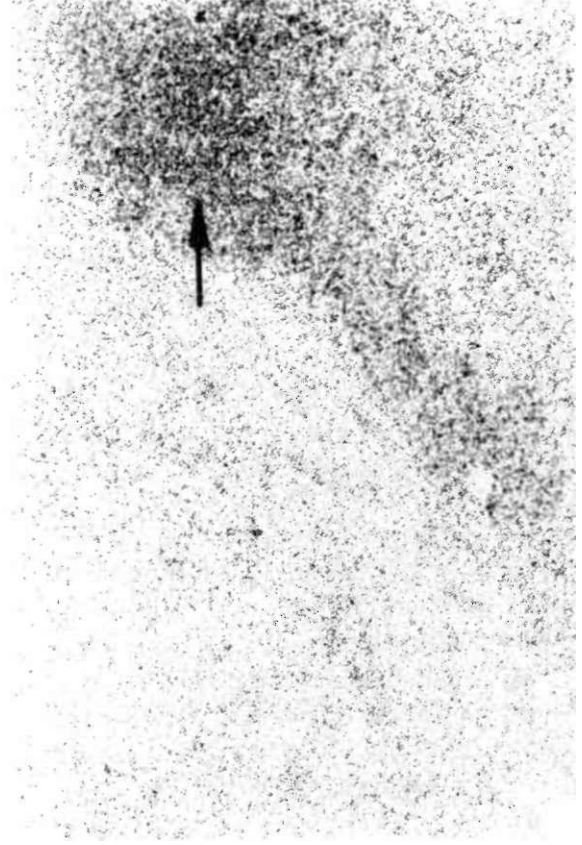


Şekil 4: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda Şekil 5'de izlenen medulla düzeyinden daha üst seviyeden geçen transvers bir kesitte nükleus olivaryus inferior'da (0) orta derecede yoğun grain dağılımı görülüyor. Kesitin üst kısmınıserebellum korteksi izlenmektedir. Pironin-Y x 3.2.



Şekil 5: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda medulladan yapılan transvers bir kesitte 4. ventrikül yakınında nükleus traktus solitarius'da (ok) çok yoğun grain dağılımı görülüyor. Pironin-Y x 12.5.

boynuzunun lamına I ve lamina H'sinde trigeminal nükleusun substansiya jelatinozası, vagus sinirinin



Şekil 6: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda medulladan yapılan transvers bir kesitte spinal trigeminal traktus ve nükleus (ok) da çok yoğun grain dağılımı görülüyor. Pironin-Y x 25.

nükleusları ve area postrema'da opioid reseptörleri gösterilmiştir. Aynı yıl içerisinde Kuhar ve arkadaşlarınınca yapılan başka bir çalışmada da, bu bölgelere nükleus kaudatus, putamen, amygdaloid nüklear kompleks ve periventriküler gri cevher bölgeleri eklenmiştir (2,15).

1980 ve 1981 yıllarında yapılan çalışmalarda ise, sempatik gangliyon, adrenal medulla, intestinal sistem ve pankreasda endojen opiyadlar ve onların reseptörleri bulunmuştur (16,18).

Yapılan çalışmalarda spinal kord arka boynuzunda opioid reseptörlerinin çok yoğun olarak gösterildiği bölgeler, Raxed'ın lamina I ve lamina II sahalarıdır. Bu bölgeler ağrı impulslarının afferent lifleri olan ince miyelinli A delta ve miyelinsiz C liflerinin spinal kordun arka boynuzundan girdikten sonra substansiya jelatinozada sinaps yaptıkları bölgelerdir. Zararlı uyarın sonucu

meydana gelen, çabuk iletilen batıcı tipteki ağrı impulsları A delta lifleri ile, yanıcı zayıf lokalize duyular ise miyelinsiz C lifleri ile iletilirler. Böylece, lamina I ve lamina II sahaları ağrı ile ilgili bilginin visseral ve somatik organlardan daha yüksek merkezlere iletiminde rol oynarlar (2,10,11). Çalışmamızda spinal kordun servikal bölge kesitlerinde grain yoğunluğunun lamina I (Zona Marginalis) ve lamina II'de (substansiya jelatinoza) lokalize olduğu görüldü. Yoğunluk derecesi yönünden çok yoğun olanlara uyuyordu, diğer laminalar ve beyaz cevher az yoğun alanlar olarak dikkati çekti.

Atweh ve arkadaşlarınınca yapılan çalışmada, medulla oblongatada otohloradyografik çok yoğun alanlar nükleus traktus solitarius, nükleus ambiguus, nükleus kommissuralis olarak belirtilmiştir (2). Orta derecede grain yoğunluğu gösteren alanlar ise, spinal trigeminal nükleus ve traktusu ile nükleus interkalatusdur (2).

Bu çalışmada da, medulla oblongata kesitlerinde bildirilen bölgelerden, nükleus traktus solitarius ve spinal trigeminal nükleus ve traktusu çok yoğun alanlar olarak nitelendirildi. Nükleus am-

bigusta grain yoğunluğu izlenmedi. Nükleus olivaryus inferiorunda orta derecede yoğun grain dağılımı dikkati çekti.

Gerek literatür bulguları, gerekse çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular opioid reseptörlerinin spinal kord ve medulla oblongata düzeyindeki dağılımlarının spinal ve supraspinal seviyelerde analjezik etki mekanizmasını açıklamakta çok önemli olduğunu göstermektedir (4,12,15).

Bu çalışmanın verileri ile literatürle uyumlu olarak şu sonuçlar elde edilmiştir.

Spinal kord kesitlerinde gri cevherde endojen opioid reseptörlerinin çok yoğun grain dağılımı gösteren bölgeleri arka boynuzun lamina I ve lamina II sahalarıdır. Bu bölgeler ağrı ile ilgili liflerin (A delta ve C lifleri) ilk sinops yaptıkları yerlerdir. Böylece endojen opioidlerin ağrı yolları ile olan ilişkisi açıklanmaktadır.

Nükleus olivaryus inferiorunda orta derecede grain yoğunluğunun görülmesi bu nükleusun ekstrapiramidal sistem nükleusları ve formasyo retikularise ait nükleuslarla afferent ve efferent bağlantıları nedeniyle olabileceğini düşündürmüştür.

1. Anderson CH, Greenwald GS. Autoradiographic analysis of estradiol uptake in the brain and pituitary of the female rat. *Endocrinology*. 85: 1160, 1969.
2. Atweh SF, Kuhar MJ. Autoradiographic localization of opiate in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. *Brain research*. 12: 53-67, 1977.
3. Bardo MT, Bhatnagar RK. Chronic naltrexone increases opiate binding in brain and produces supersensitivity to morphine in the locus coeruleus of the rat. *Brain Research* 289: 223-224, 1983.
4. Bird SJ, Kuhar MJ. Ionophoretic application of opiates to the locus coeruleus. *Brain Research*. 122:523-533, 1977.
5. Booth AM, Hisamitsu T. Regulation of urinary bladder capacity by endogenous opioid peptides. *The journal of urology*. 133: 339-342, 1985.
6. Brzewlocki B, Stala L. The effect of various opiate receptor agonists on the seizure threshold in the rat. Is dynorphin an endogenous anticonvulsant. *Life Sciences*, 33:595-598, 1983.
7. Dray A, Nunan L. Opioid inhibition of reflex urinary bladder contractions. Dissociation of supraspinal and spinal mechanisms. *Brain Research*. 337:142-145, 1985.
8. Faden A, Molineaux CI. Endogenous opioid immunoreactivity in rat spinal cord following traumatic injury. *Ann Neurol*. 17: 386-390, 1985.
9. Faden A. Opiate antagonists and thyrotropin-releasing hormone. *Jama*, 252:1177-1180, 1984.
10. Guyton A. The dual pathway for transmission of pain signals into the central nervous system. In: *Textbook of medical physiology*. WB Saunders Company. 1986,594-595.
11. Hamm R.J, Knisely J.S. Environmentally induced analgesia. An age-related decline in an endogenous opioid system. *Journal of Gerontology*. 3: 268-274, 1985.
12. Kamerling S.G, Martin W.R. Medullary K hyperalgesic mechanisms II. the effects of ethketazocine administered into the fourth cerebral ventricle of the conscious dog. *Life Sciences*, 33: 1839-1843, 1983.
13. Kitchen J. The rise and fall of endogenous opioid nomenclature. *Progress in Neurobiology*. 22: 345-358, 1984.
14. Kalelioğlu, M.; ceylan, S., Aktürk, F., Özoran, Y.: Deneysel Spinal kord travmalarında Naloxan ve Metil prednizolonun etkileri. *Ege Nörolojik Bilimler Dergisi* 3: 109-112, 1986.
15. Pert C.B, Kuhar M.J. Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain. *Life Science*. 16:1849-1951, 1975.
16. Şadan, G.: Enfakalinlerin ve enkefalinaz inhibitörlerinin farmakolojik açıdan önemleri. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. Cilt. 26:431-435, 1987.
17. Young W.S, Kuhar M.J. A new method for receptor autoradiography. H3 Opioid receptors in rat brain. *Brain Research*. 179: 255-270, 1979.
18. Zaloga G.P, Hostinsky C. Endogenous opioid peptides. Critical care implications. *Reviews in critical care*. 13: 421-430, 1984.